

原 著

カテキン含有飲料のサルモネラに対する殺菌および増殖抑制効果の検討

小 林 菜津美¹⁾, 西 川 武 志^{1, 4)}, 岡 安 多香子¹⁾, 山 田 玲 子¹⁾, 磯 貝 恵美子²⁾,
磯 貝 浩³⁾, 山 下 利 春⁴⁾

¹⁾北海道教育大学札幌校医科学看護学, ²⁾北海道医療大学口腔衛生, ³⁾札幌医科大学医学部動物実験施設部,

⁴⁾札幌医科大学医学部皮膚科学講座

(平成17年11月21日受付)

(平成17年12月26日受理)

食中毒起因菌である *Salmonella* Enteritidis 5 株 (SE 1, SE 2, SE 3, SE 4 および SE 5 株) に対するカテキン含有飲料の増殖抑制作用および殺菌作用について検討した。

カテキン添加培地中 (カテキン濃度 0.5 mg/ml) において, *S. Enteritidis* 5 株すべての増殖が抑制された。各茶培地で検討したところ, 紅茶培地 (カテキン濃度 0.8 mg/ml) は今回検討した *S. Enteritidis* 5 株すべての増殖を強く抑制した。緑茶培地 (0.7 mg/ml) およびウーロン茶培地 (0.5 mg/ml) は, 紅茶培地ほどではないが, 各菌株に対して増殖抑制作用を示した。麦茶培地 (0 mg/ml) はカテキン含有量はごく微量ながら, カテキン添加培地と同等の増殖抑制作用を示した。また, 緑茶は今回検討した *S. Enteritidis* 5 株すべてに対して強い殺菌作用を示した。これらの結果から, 茶を飲むことは, *S. Enteritidis* による食中毒を予防するのに有効である可能性が示唆された。

近年, わが国の食をとりまく環境は衛生状態の向上や衛生行政の指導などにより大幅に改善され, その結果, かつて多発していた食中毒の発生件数は1986年以降, 1年間で1000件以内に減少した^{1, 2)}。しかし, 1996年 (平成8年) 以降食中毒発生件数は再び増加し, 1998年 (平成10年) には3010件にものぼった¹⁾。食中毒起因菌に注目してみると, これまで腸炎ビブリオが主たる原因菌であったが, 1992年にサルモネラ (*Salmonella*) がそれを上回り, その後も減少する傾向は見られない²⁾。サルモネラの中でも特に, 一血清型である *S. Enteritidis* によるものが急増している。1985年頃よりイングランドやスコットランドなどで *S. Enteritidis* によるサルモネラ症が急増したが, その原因食品が汚染された鶏卵であること

が報告されている。日本における1989年以降の *S. Enteritidis* による食中毒の増加も欧米, 特に欧州からの輸入種鶏によるサルモネラ汚染が原因の一つであると多くの研究者により推測されている²⁾。鶏卵はわが国において年間250万トン消費されているが, この鶏卵あるいはその加工品へのサルモネラ汚染は次のような経路が考えられる²⁾。

第1の経路は産卵された時点ですでに卵中にサルモネラが存在している場合である。第2の経路は産卵時に産卵鶏の糞便が卵殻表面に付着する場合である。第3の経路は産卵直後の卵殻がまだ湿潤状態のときにケージ内でサルモネラに汚染されたり, あるいはサルモネラが卵殻表面に作業者を介して付着, 汚染する場合である。第4の経路は鶏卵等級付け選別包装施設で汚染される場合である。第5の経路は卵を洗浄処理後, 夏季の室温など比較的高い温度下で長時間保存して卵の菌数が増加してくる場合である²⁾。上記の第2から第5のような経路を通じて汚染卵が正常な卵と一緒に利用された場合, その被害は甚大となる。

なお, 近年人気の洋風生菓子や自家製マヨネーズなど, 卵を加熱処理せずに使う食品をはじめ, 鳥獣肉, 農産物とそれらの各種加工品, 生の臓器 (肝臓など), うなぎの調理食品, 牛乳および乳製品, チョコレートやココナツ, 野菜などを原因としてサルモネラ症が発生したという報告もある²⁾。このように, サルモネラはわれわれの身近なところに幅広く分布している。

カテキンには, 抗ウイルス作用^{4, 5, 7, 9)}, 殺菌作用^{3, 6)}, 抗腫瘍作用^{7, 10)}, 抗齲蝕作用⁷⁾, 抗酸化作用^{7, 10)}なども認められ, 茶に含まれるカテキンに関する研究が盛んに行われており, その効果は一般の人にも広く知られるところとなっている。さまざまな分野からカテキンがもたら

す効果への期待が寄せられており、食中毒の予防もその一つである。

カテキン類 (Catechins) は多数の植物中に含まれ、花の色や紅葉、黄葉などの色素であるフラボノイドに属し、タンニンの母体と考えられ水に溶解しやすい¹²⁾。カテキンは化学名を flavan 3-ols といい、フラバノール構造をとる^{5,11)}。ベンゼン環に水酸基が2つ以上つくことからポリフェノール (polyphenol) とも称される^{10,11,13)}。茶の味成分のうち最も多く含まれ、苦渋味を呈する茶の主要成分である。カテキン類はいずれも無色で、カテキンは苦みを、ガレート (gallate: カテキンの3位の没食子酸エステル) は渋味を呈する¹⁴⁾。

カテキンは2, 3位に2個の不斉炭素を持ち、4種の光学異性体がある。茶葉中においては(-)-エピ体と(+)-体およびgallateが主体であるが、抽出や製茶の過程で異性化によって生じたものと考えられる(-)-体や(+)-エピ体も少量含まれている¹⁴⁾。

カテキンの含有量は緑茶に多いが、製造過程で発酵させる茶(紅茶、ウーロン茶、プーアル茶等)では、polyphenol-oxidaseの作用によりカテキンが酸化重合するので、含有量は少なくなる。特にプーアル茶のように蒸熱処理後、堆積発酵させると、カテキン類は極度に酸化重合するので、カテキン類含有量は極めて少なくなる^{10,15)}。

1996年5月より全国各地で多発し、日本中を脅かした腸管出血性大腸菌O157による感染症は記憶に新しいが、1998年にはそのO157に対するカテキンの殺菌作用および抗毒素作用が報告されている^{4,6)}。

カテキンは、日本で頻繁に飲用されているお茶の成分である。本研究では、カテキン含有飲料の食中毒予防における効果を検討することを目的として、*S. Enteritidis* に対する増殖抑制作用、殺菌作用について検討した。

方 法

1 使用菌株

S. Enteritidis SE 1株、SE 2株、SE 3株、SE 4株およびSE 5株 (それぞれ異なる養鶏場から出荷された鶏肉から分離されたものであり、北海道医療大学口腔衛生学講座 磯貝恵美子博士より分与された。)

2 使用培地および菌の培養条件(茶類およびカテキンのサルモネラに対する増殖抑制作用および殺菌作用)

LB 液体培地及び茶類含有培地にて37℃で静置培養

し、3時間から7時間後まで1時間毎に、吸光度(OD₆₀₀)を測定した。また、生菌数は、BRAIN HEART INFUSION AGAR 平板培地で、37℃、18-24時間培養し、算出した。上記の作業をいずれも3回行い、平均値を求め、t-testを用いて解析した。

また、Phosphate-buffered saline (pH7.4)と緑茶に用意した各菌を加え、よく混和し室温で1時間静置培養したものをPBSで10⁴倍に希釈し、BHI AGAR 平板培地で、37℃、24時間培養し、生菌数を算出した。上記の作業をいずれも3回行い、平均値を求めた。

3 各茶培地の作製

(1) 茶類およびカテキンのサルモネラに対する増殖抑制作用

LB BROTH LENNOX (10g) に水および各茶を加え全量を500mlとし、よく混和し、室温で3時間静置し、濾紙で濾過して、使用時まで-30℃で凍結保存した。

茶は市販のウーロン茶[商品名: 鳳凰 (KIRIN)], 緑茶[商品名: おーいお茶 (伊藤園)], 紅茶[商品名: 午後の紅茶ストレート (KIRIN)] 及び麦茶[商品名: 六条麦茶 (KAGOME)] を使用した。

各茶のカテキン濃度は、烏龍茶0.5mg/ml、緑茶0.7mg/ml、紅茶0.8mg/ml、麦茶0.0mg/mlである。

カテキンは、カメラア50EX, 980828 (日進香料株式会社)を用いた。通常の飲用に供する茶に含まれるカテキン濃度と同程度(0.5mg/ml)のカテキンをLB BROTH LENNOXで希釈し、0.5カテキン液として使用した。

(2) 緑茶の菌に対する殺菌作用

緑茶[商品名: 深蒸し煎茶 茶娘 (竹中園)] 20gを200mlの熱湯で室温で10分間浸出して得たものを使用した。

結 果

1 茶類含有培地中でのサルモネラの増殖抑制効果

(1) 吸光度の増加からみた増殖抑制効果 (図1)

培地ごとに増殖の抑制効果は異なるが、各菌株での吸光度を平均すると、紅茶培地において他の培地よりも有意に生菌数が少なかった(緑茶: $p < 0.05$, その他: $p < 0.01$)。次にウーロン茶培地および緑茶培地、カテキン培地および麦茶培地の順であった。

LB 液体培地 (コントロール) においては、培養開始後3-6時間の3時間においてSE 1株では吸光度が0.419増加し、SE 2株では0.302増加、SE 3株では0.427増加、SE 4株では0.372増加、SE 5株では0.384増加し

た。培養開始後 6 - 8 時間の 2 時間では, SE 1 株の吸光度は 0.059 増加し, SE 2 株は 0.128 増加, SE 3 株は 0.043 増加, SE 4 株は 0.095 増加, SE 5 株では 0.079 増加した。

培養時間前半 (培養開始後 3 - 6 時間の 3 時間) においては, 各菌株の生菌数の増殖に 25.8 ~ 58.9 倍と開きがあったものの, いずれの菌株もこの時期までに急激な増殖をするという点で同様の傾向を示した。培養時間後半

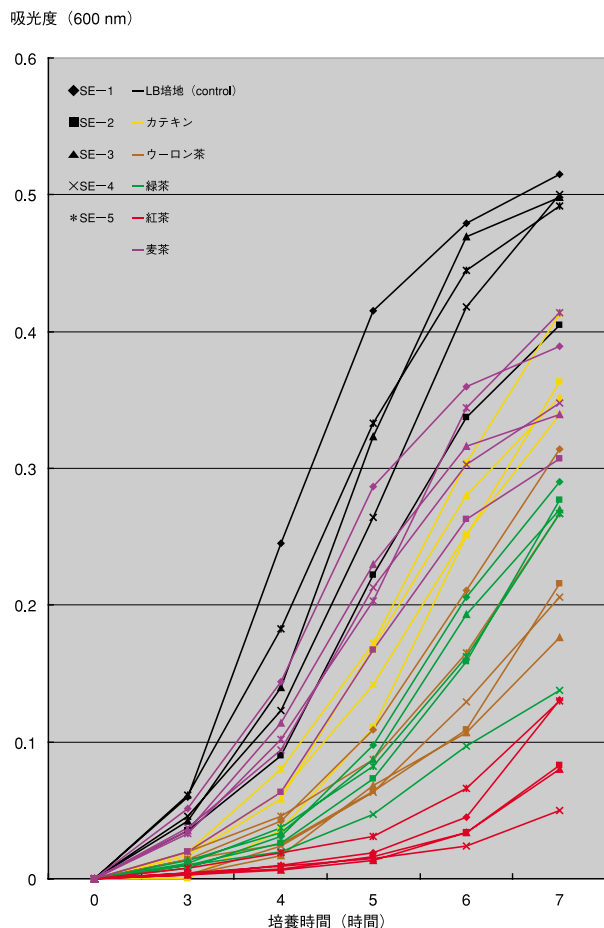


図 1 増殖曲線からみた各茶培地の *S. Enteritidis* に対する増殖抑制効果の比較

(培養開始後 6 - 7 時間の 1 時間) においても, すべての菌株が 1.2 倍ほどの増殖であり, 明らかな差は認められなかった。前半に比べ, 後半では著しい増殖の勢いの衰えがみられた。

カテキン培地において, SE 1 株に対しては 3 - 4 時間, SE 2 株には 4 - 5 時間 ($p < 0.05$), SE 3 株には 3 - 6 時間 ($p < 0.01$), SE 4 株には 3 - 4 時間, 5 - 6 時間 ($p < 0.01$) 及び 6 - 7 時間 ($p < 0.05$) で有意に増殖抑制効果が認められた。SE 5 株においては有意差は認められなかった。

ウーロン茶培地において, SE 1 株及び SE 2 株に対しては 0 - 3 時間 ($p < 0.05$), SE 3 株に対しては 3 - 6 時間 (3 - 4 時間: $p < 0.01$, 4 - 6 時間: $p < 0.05$), SE 4 株には 0 - 4 時間 ($p < 0.05$) 及び 6 - 7 時間 ($p < 0.01$), SE 5 株には 0 - 3 時間 及び 6 - 7 時間 ($p < 0.05$) で増殖抑制効果が認められた。

緑茶培地において SE 1 株に対しては 5 - 6 時間, SE 4 株に対しては 0 - 5 時間, SE 5 株には 5 - 6 時間 ($p < 0.05$) で増殖抑制効果が認められた。SE 2 株及び SE 3 株においては有意差は認められなかった。

紅茶培地において, SE 1 株に対しては 5 - 7 時間 ($p < 0.01$), SE 2 株に対しては 6 - 7 時間, SE 3 及び SE 4 株に対しては 0 - 3 時間 及び 5 - 7 時間, SE 5 株には 5 - 7 時間 ($p < 0.05$) で増殖抑制効果が認められた。紅茶培地においては, すべての菌株に対して 5 - 7 時間に強く増殖を抑制しているという傾向がみられた。

麦茶培地においては, SE 4 株及び SE 5 株に対して 6 - 7 時間 ($p < 0.05$) にのみ増殖抑制効果が認められた。

(2) 生菌数からみた増殖抑制効果 (図 2)

対数増殖期の各茶培地における増殖抑制作用を比較するために, 培養 5 時間での生菌数を比較した。

カテキン培地においては, SE 3, SE 1, SE 4, SE 2, SE 5 の順に増殖抑制効果が高く, ウーロン茶培地と紅茶培地においても同様の順であった。緑茶培地においては SE 4, SE 3, SE 1, SE 5, SE 2 の順, 麦茶培地においては SE 1, SE 5, SE 3, SE 2, SE 4 の順であった。以上のように培地ごとに効果の強さは異なるものの, コントロール (LB 培地) と比較し, 今回用いたすべての茶培地において *S. Enteritidis* の増殖が有意に抑制された ($p < 0.05$)。

各菌株の生菌数を平均すると, 紅茶培地において他の培地よりも有意に生菌数が少なく, 増殖抑制効果が最も高かった。その次にウーロン茶培地及び緑茶培地, カテキン培地及び麦茶培地の順であった。ウーロン茶培地及び緑茶培地, カテキン培地及び麦茶培地の間に有意差は認められなかった。

2 緑茶の殺菌作用 (表 1)

SE 1 株においては, コントロールの生菌数が平均 8.23×10^8 個/ml であった。それに比べて, 緑茶処理後では平均 2.01×10^8 個/ml であり, これはコントロールの約 24% であった。

SE 2 株においては, 緑茶処理後の生菌数がコントロー

ルの約7%であり, 5株の *S. Enteritidis* 中, 最も殺菌作用が顕著であった。SE 3株では約19%, SE 4株では約29%, SE 5株では約21%の生菌数となり, 各々殺菌作用が示された。

考 察

紅茶培地, 緑茶培地, ウーロン茶培地, 麦茶培地の4種の各茶培地は, 今回検討した *Salmonella Enteritidis* SE 1

株, SE 2株, SE 3株, SE 4株及びSE 5株すべてに対して増殖抑制作用を示した。

カテキン培地よりもカテキンを多く含む紅茶培地(カテキン濃度0.8mg/ml), 緑茶培地(カテキン濃度0.7mg/ml), カテキン培地と同濃度のカテキンを含むウーロン茶培地(カテキン濃度0.5mg/ml)中では, すべての菌株に対してカテキン培地よりも強い増殖抑制効果を示した。実際に飲用している茶にはカテキンの他に, カフェインなどの物質が含まれている^{12, 15)}。これらの物質には単体ではほとんど抗菌作用が認められていないが, カテキンとの相互作用により増殖抑制作用を示した可能性があるのではないかと考えられた。

また, 紅茶培地の各菌株に対する増殖抑制作用は, 緑茶培地やウーロン茶培地よりも強く認められた。各茶には前述のようにEGCgをはじめとするエピカテキン類が含まれている。抗菌作用はそれらのエピカテキン類による作用であると考えられている。紅茶にはさらに色素の一つである theaflavin (TF) が含まれている。TFはスーパーカテキンとも呼ばれ, EGCgに比べてTFの方が抗菌力・殺菌力が共に強いことが報告されている⁴⁾。これらの理由から今回の実験では紅茶培地による増殖抑制作用が他の茶に比べて強かったのではないかと考えられた。

また, カテキンをほとんど含まないとされる麦茶培地(カテキン濃度0 mg/ml)中においても, 他のカテキンを多く含む培地中ほどではないがコントロールの値を常に下回り, 増殖抑制効果を示した。これは, 麦茶にはカテキン類がごく微量しか含まれていないが, カテコール, 没食子酸, ゲンチシン酸といった, 別の因子が含まれていることから^{16, 17)}, これらの成分が菌の増殖に何らかの影響を与えたことが推測された。

緑茶は *S. Enteritidis* 5株すべてに対し, 殺菌作用を示した。このことから, 緑茶の日常的な飲用は, *S. Enteritidis* などによる食中毒を予防する効果があると考えられた。

茶類・カテキンは, 今回検討した *S. Enteritidis* に対して増殖抑制作用^{3, 5, 6)}を示し, また緑茶は殺菌作用も示した。茶は嗜好飲料として飲用されることが多く, その濃度で充分, 菌の増殖抑制作用, 殺菌作用が認められた。また, 茶の毒性は極めて低く副作用の心配も無いとされている。本研究は *in vitro* によるものであったが, 今回の研究結果と安全性の実績から考えて茶を飲用することは, サルモネラによる食中毒の予防に有効である可能性が示

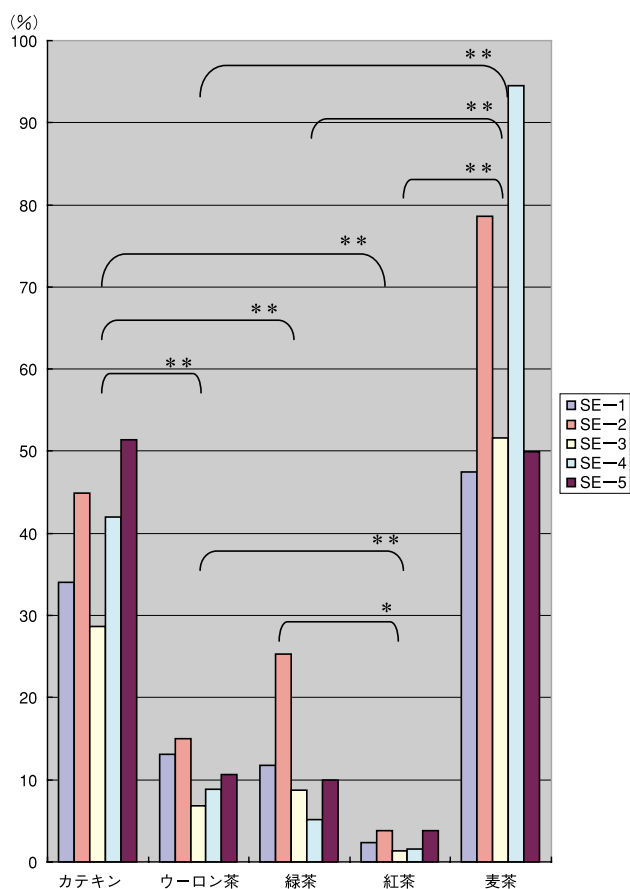


図2 対数増殖期の *S. Enteritidis* に対する各茶培地の増殖抑制効果の比較
LB 培地における生菌数に対する割合 (%) を示す
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

表1 緑茶の *S. Enteritidis* に対する殺菌作用

菌株	試験液中での生菌数 ($\times 10^8$ /ml)		残存率 (%) ¹⁾
	PBS	緑茶	
SE 1	8.23	2.01	24
SE 2	4.19	0.31	7
SE 3	7.37	1.39	19
SE 4	6.29	1.81	29
SE 5	2.21	0.47	21

1) 緑茶中の生菌数/PBS 中の生菌数 $\times 100$

唆された。また、本研究では紅茶に最も増殖抑制効果が認められ、また、病原性大腸菌においても他の茶類に比べ紅茶に最も強い増殖抑制作用が認められている^{18,19)}。以上から、紅茶にはサルモネラに対しても強い殺菌効果が期待できると考えられた。

茶は、さまざまな生理活性を有することが報告されている。インフルエンザ予防のため、紅茶でのうがいがある効であるとの報告 (*in vivo*) もある^{8,9)}。しかし、多くはまだ基礎的段階の研究で、臨床的に十分検討されたものではない。よって、今後の臨床的なりサーチにより茶のさまざまな作用がさらに明解にされることが期待されている。

文 献

- 1) 食中毒発生状況，厚生労働省食中毒発生状況の報告書，2000
- 2) 高橋史生，川上英之：食中毒起因菌としてのサルモネラ．New Food Industry，38(8)：6-10，1996
- 3) 戸田眞佐子，大久保幸枝，大西玲子，島村忠勝：日本茶の抗菌作用および殺菌作用．日本細菌学雑誌 44(4)：669-672，1989
- 4) 島村忠勝：茶の成分カテキンによる抗菌・抗ウイルス作用．LABEAM，8(12)：1-3，1996
- 5) 戸田眞佐子，島村忠勝：目で見る最新医学 カテキン．昭和医学会雑誌，57(3)：175-189，1997
- 6) 大久保幸枝，佐々木武二，原 征彦，森扶美代 他：腸管出血性大腸菌 O157：H7 に対する Catechin の殺菌および抗毒素作用．感染症学雑誌，72(3)：211-217，1998
- 7) 福島敬一：茶の保健作用，茶の大事典．お茶の大事典刊行会，静岡，1991，pp 315-321
- 8) 中山幹男，戸田眞佐子，大久保幸枝，原 征彦 他：紅茶エキスによるインフルエンザウイルス感染性の阻止 - *in vivo* における検討 - ．感染症学雑誌 68(7)：824-829，1994
- 9) 岩田雅史，戸田眞佐子，中山幹男，辻山博之 他：紅茶エキスのうがいによるインフルエンザ予防効果．感染症学雑誌，71(6)：487-493，1997
- 10) 富田勲：茶の科学．ファルマシア，31(1)：36-41，1995
- 11) 池ヶ谷賢次郎：a．茶の製造法による分類．茶の科学，朝倉書店，東京，1991，pp 116-117
- 12) 福島敬一：茶の成分．茶の大事典，お茶の大事典刊行会，静岡，1991，pp 309-314
- 13) 山根一元：知れば知るほど深いなるほどポリフェノール事典．緑茶パワー健康法，KK ベストセラーズ，東京，1993，pp 28-33
- 14) 中林敏郎，伊奈和夫，坂田完三：1．タンニン，茶葉の化学成分．緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能，弘学出版，川崎，1991，pp 20-29
- 15) 池ヶ谷賢次郎：4．1 茶の化学成分とその含有量．茶の科学，朝倉書店，東京，1991，pp 85-92
- 16) 梶本五郎，鬼武直子，奥田浩子，村上智嘉子：麦茶の抗酸化性と抗酸化成分．日本食品科学工学会誌 46(2)：67-74，1999
- 17) 斎藤八郎：なぜ 麦茶は飲まれるのか？食糧月報 3(7)：62-66，1998
- 18) Nishikawa,T., Isogai,E., Isogai,H., Ohba,T., *et al* : Inhibition of Growth and Toxin Production in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by Tea and Catechin Drinks. Japanese Journal of School Health, 43 : 100-102, 2002
- 19) Nishikawa,T., Isogai,E., Isogai,H., Ikeno,H., *et al* : Inhibitory Effect of Growth and Toxin Production in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by Tea. Japanese Journal of School Health, 44 : 160-162, 2003

Inhibitory effects of Catechin-Containing drinks on the growth of Salmonella Enteritidis

Natsumi Kobayashi¹⁾, Takeshi Nishikawa^{1,4)}, Reiko Yamada¹⁾, Emiko Isogai²⁾, Hiroshi Isogai³⁾ and Toshiharu Yamashita⁴⁾

¹⁾Division of Medicine and Nursing, Hokkaido University of Education, Hokkaido, Japan ; ²⁾Department of Preventive Dentistry, Health Science University, Hokkaido, Japan; ³⁾Animal Research Center, Sapporo Medical Research, Hokkaido, Japan; and

⁴⁾Department of Dermatology, Sapporo Medical University, Hokkaido, Japan

SUMMARY

Salmonella strains are the most prevalent etiological agents for food poisonings in Japan since 1992. Tea is widely consumed in Japan, and catechin and its derivatives in tea show anti-microbial effect. In this study, we compared the inhibitory effects of catechin-containing drinks against the growth of *S. Enteritidis*. The growth inhibition was more evident in black tea, oolong tea, and green tea, which contain larger amount of catechin with galloy moiety such as epigallocatechin gallate and epicatechin gallate than barley tea. Of the four kinds of tea evaluated, black tea demonstrated the most potential for the growth inhibition of *S. Enteritidis*. Theaflavin 3 in black tea probably gave the additional effect in concert with catechin. Barley tea also showed the inhibitory effect against the growth of *S. Enteritidis* despite the tea contains a trace amount of catechin, suggesting that the other components than catechin contribute to the growth inhibition. The results in this study indicate that consumption of tea reduces the risk of foodborne illness by pathogenic bacteria.

Key words : food poisoning, catechin, *Salmonella* Enteritidis